

0 7 2 4 2 5 2 - 1

КАЗАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

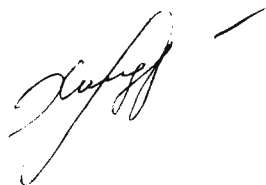
На правах рукописи

**ХАЛДЕЕВА Елена Владимировна**

**АМПЕРОМЕТРИЧЕСКИЕ ИММУНОФЕРМЕНТНЫЕ СЕНСОРЫ ДЛЯ  
БИОМЕДИЦИНСКОГО АНАЛИЗА**

02.00.02 - аналитическая химия

**А в т о р е ф е р а т**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата химических наук



Казань –2001

Работа выполнена на кафедре аналитической химии Казанского государственного университета

Научный руководитель: доктор химических наук,  
профессор Э.П.МЕДЯНЦЕВА

Научный консультант: доктор химических наук, профессор,  
член-корр. РАЕН, академик МАНВИШ  
Г.К. БУДНИКОВ

Официальные оппоненты: доктор химических наук, профессор  
Е.Н. Офицеров  
  
кандидат химических наук, доцент  
С.Ю. Гармонов

Ведущая организация: Институт биохимии и физиологии  
микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН,  
г. Пущино

Защита состоится "12" ноября 2001 г. в 14 часов  
на заседании диссертационного Совета К 212.081.04. по химическим наукам  
Казанского государственного университета, по адресу:  
420008, г. Казань, ул. Кремлевская, 18, химический факультет,  
Бутлеровская аудитория.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке  
им. Н.И. Лобачевского Казанского государственного университета.

Отзывы на автореферат просим присылать по адресу:  
420008, г. Казань, ул. Кремлевская, 18, КГУ, научная часть.

Автореферат разослан "15" октября 2001 г.

НАУЧНАЯ БИБЛИОТЕКА  
КФУ



Ученый секретарь  
диссертационного Совета  
кандидат химических наук

Зазыбин А.Г.

0724252-1

**Актуальность темы:** Иммунохимические методы анализа в настоящее время являются

являются одним из наиболее интенсивно развивающихся направлений аналитической химии. Благодаря высокой чувствительности, селективности, возможности автоматизации, проведения анализа в проточном режиме иммунохимические методы находят применение в клинической химии, ветеринарии, пищевой промышленности, биотехнологии и других областях для определения широкого круга биологически активных веществ. Одним из перспективных направлений в этой области является разработка иммуноферментных сенсоров (ИФС), объединяющих специфичность действия антител и фермента и позволяющих добиться значительного усиления аналитического сигнала. Отсутствие систематических подходов к созданию таких устройств делает весьма актуальной оценку возможности использования единой модели ИФС для определения отличающихся по происхождению и физиологической роли биологически активных соединений. Вольтамперометрическое детектирование ферментативной метки позволяет разработать аналитические устройства, обладающие экономичностью, достаточно высокой чувствительностью, специфичностью, точностью и экспрессностью определения.

Изучение влияния различных эфektorов на каталитические свойства ферментов позволяет значительно расширить аналитические возможности иммуноферментного анализа. Использование данных ферментативной кинетики в этом случае дает возможность оценить влияние различных факторов на характер протекания ферментативного процесса, что может оказаться весьма полезным для выбора условий функционирования и получения положительных результатов при работе с иммуноферментными сенсорами.

Работа проводилась при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, проекты № 97-03-33232а, № 00-03-32389а, № 01-03-06047 (грант для поддержки молодых ученых).

**Цель исследования** заключалась в разработке новых амперометрических иммуноферментных сенсоров для чувствительного и селективного определения различных по природе и происхождению биологически активных веществ, в том числе антител, на примере специфического иммуноглобулина Е человека (IgE), антигенов патогенного гриба *Trichophyton rubrum* и фитопатогенного гриба *Phoma betae*, ферментов, на примере рибонуклеазы, и аминокликозидного антибиотика гентамицина, с использованием данных кинетики ферментативной реакции для выбора рабочих условий проведения иммуноферментного анализа.

**Научная новизна и практическая значимость:** Предложены и обоснованы подходы к селективному определению биологически активных веществ с помощью разработанных амперометрических иммуноферментных сенсоров на основе совместно иммобилизованных иммунореагентов и холинэстеразы.

Выявлено влияние иммунных комплексов антиген-антитело (Ag-At) на каталитическую активность иммобилизованной холинэстеразы (ИХЭ). Определены кинетические параметры (кажущиеся константы Михаэлиса ( $K_{m(каж)}$ ), максимальные

скорости ( $V_m$ ) реакции холинэстеразного гидролиза в присутствии эффекторов, а также константы связывания иммунных комплексов. Изучено влияние различных факторов (рН, концентраций субстрата и компонентов биоспецифических взаимодействий) на характер протекания ферментативного процесса. На основании данных кинетических исследований выбраны условия проведения иммуноопределений с помощью ИФС. Разработан способ регенерации биочувствительной части ИФС.

Оценены значения констант связывания иммунных комплексов антиген-антитело, а также перекрестная реактивность используемых иммуореагентов.

Разработаны методики определения специфического IgE, антигенов *Trichophyton rubrum* и *Phoma betae* в биологических жидкостях, рибонуклеазы в мясе и мясопродуктах, а также гентамицина в пищевых продуктах (молоке) и лекарственных формах с помощью ИФС.

Представлены практические рекомендации по использованию разработанных ИФС в биомедицинском анализе для диагностики аллергических и грибковых заболеваний

#### На защиту выносятся:

- Модель иммуоферментных сенсоров на основе совместно иммобилизованных холинэстеразы и компонентов иммунологической реакции для определения различных биологически активных соединений
- Результаты исследования влияния иммунных комплексов антиген-антитело на каталитическую активность иммобилизованной холинэстеразы
- Интерпретация кинетических параметров реакции холинэстеразного гидролиза бутирилтиохолин иодида (БТХИ) в присутствии иммунных комплексов; результаты изучения влияния рН, концентрации субстрата на характер протекания ферментативного процесса.
- Оценка и сопоставление значений констант связывания иммунного комплекса антиген-антитело
- Новые способы иммуоферментных определений специфического иммуоглобулина Е, антигенов *Trichophyton rubrum*, *Phoma betae* в биологических жидкостях, а также рибонуклеазы и гентамицина в продуктах питания
- Практические рекомендации по использованию иммуоферментных сенсоров для диагностики аллергических и грибковых заболеваний

Апробация работы: Материалы диссертации докладывались и обсуждались на XVI Менделеевском конгрессе по общей и прикладной химии (С.-Петербург, 1998 г.), Международной конференции Eurosensors XII (Саутгемптон, Великобритания, 1998 г.), Международной конференции по аналитической химии (Алматы, Казахстан, 1998), Итоговой научной конференции Казанского государственного университета (1999г.), Международной конференции для совместным электроаналитическим

ИМ. Н. И. Л. Бачевского  
Казанского гос. университета

методам (Сеч, Чехия, 1999 г.), V Всероссийской конференции "Электрохимические методы анализа" (ЭМА-99) (Москва, 1999), Всероссийских конференциях молодых ученых (Саратов, 1999 и 2001 г.), Всероссийской конференции "Химический анализ веществ и материалов" (Москва, 2000), VIII Международной конференции по Электроанализу (ESEAC'2000) (Бонн, Германия, 2000), Всероссийской конференции с международным участием "Сенсор 2000. Сенсоры и микросистемы." (С.-Петербург, 2000), IV Всероссийской конференции по анализу объектов окружающей среды "Экоаналитика-2000" (Краснодар, 2000), Международном симпозиуме по высокoeffективным методам разделения (Сюфок, Венгрия, 2001 г.) и Международном Симпозиуме по кинетике в аналитической химии (Бухарест, Румыния, 2001 г.).

**Публикации** По теме диссертации опубликовано 19 работ. Из них 6 статей и 13 тезисов докладов на всероссийских и международных конференциях.

**Структура и объем работы** Диссертация изложена на 170 страницах машинописного текста, содержит 27 таблиц и 13 рисунков. Работа состоит из введения, пяти глав, выводов, списка литературы, включающего 216 ссылок.

В первой главе представлен обзор литературы по проблеме использования различных видов иммуносенсоров в медицине и биологии для определения широкого круга биологически активных веществ, в том числе бактерий, различных антигенов, ферментов, лекарственных препаратов. Вторая глава содержит постановку задачи, описание объектов исследования, методы и условия эксперимента. В третьей главе обсуждено влияние иммунных комплексов Ag-Ат на каталитическую активность ИХЭ. Рассмотрены кинетические закономерности реакции холинэстеразного гидролиза БТХИ в присутствии иммунных комплексов. Определены кинетические параметры (кажущиеся константы Михаэлиса, максимальные скорости реакции) ферментативного процесса. Обсуждено влияние pH среды, соотношения концентраций субстрата, антигенов и антител на характер протекания холинэстеразного гидролиза БТХИ. На основании полученных кинетических данных выбраны рабочие условия проведения иммуноферментных определений с помощью ИФС. Четвертая глава посвящена оценке устойчивости иммунных комплексов, а также специфичности иммунохимических взаимодействий. Определены значения констант связывания иммунных комплексов, рассмотрены закономерности их изменения в зависимости от природы антигена. Оценена перекрестная реактивность используемых иммунореагентов. В пятой главе предложены варианты иммуноферментных определений специфического иммуноглобулина Е, антигенов *Trichophyton rubrum*, *Phoma betae*, рибонуклеазы и гентамицина с помощью амперометрических ИФС. Представлены методики определения биологически активных веществ в биологических жидкостях и пищевых продуктах. Предложены практические рекомендации по использованию ИФС для диагностики аллергических и грибковых заболеваний.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Экспериментальная работа выполнена на осциллографическом полярографе ПО-5122 модель 03 и потенциостате ПИ-50-1.1., совмещенном с IBM PC-286, с ячейкой, термостатированной при  $25.0 \pm 0.2^{\circ}$  С с помощью термостата ТС-50. Рабочими электродами служили разработанные амперометрические ИФС, состоящие из биочувствительной части на основе совместно иммобилизованных антител (Ат) или антигена (Аг) и холинэстеразы и детектирующего элемента (трансдьюсера) - стационарного ртутно-пленочного электрода с серебряной подложкой. Электрод сравнения - насыщенный каломельный электрод.

**Объекты исследования:** IgE человека, специфичный по отношению к грибковому аллергену *Phoma betae*, Аг фитопатогенного гриба *Phoma betae* (PhB) и патогенного гриба *Trichophyton rubrum* (TR), панкреатическая рибонуклеаза (РНКаза) быка, аминогликозидный антибиотик гентамицин, а также соответствующие поликлональные Ат к ним в различных разведениях. Применяли препарат бутирилхолинэстеразы (ХЭ) сыворотки крови лошади (КФ 3.1.1.8) с активностью 110 АЕ/мг. В качестве субстрата ХЭ использовали бутирилтиохолин иодид (БТХИ). Для получения биочувствительной части ИФС использовали нитрат целлюлозы типа коллоксилин со средним содержанием азота 11.5 - 12 %.

Оценку значений констант связывания проводили по вольтамперометрическим данным, используя метод Скэтчарда. Определение параметров ( $K_{m(изж)}$ ,  $V_m$ ) реакции холинэстеразного гидролиза в отсутствие и в присутствии компонентов иммунохимического взаимодействия проводили, исходя из полной кинетической кривой зависимости величины тока от времени при определенной концентрации субстрата методами нелинейной регрессии.

### ИММУННЫЕ КОМПЛЕКСЫ АНТИГЕН - АНТИТЕЛО КАК ЭФФЕКТОРЫ ИММОБИЛИЗОВАННОЙ ХОЛИНЭСТЕРАЗЫ

Изучение основных закономерностей биоспецифических реакций, а также влияния иммунологической реакции на каталитическую активность ИХЭ проводили, используя иммунные пары отличающихся по природе биологически активных соединений: специфический IgE человека – Аг *Phoma betae*; а также Аг *Trichophyton rubrum*, рибонуклеаза, гентамицин и соответствующие специфические Ат, с целью разработки общих подходов, необходимых для создания новых способов определения других физиологически активных веществ.

Иммуноглобулины Е – высокоактивные Ат, вырабатываемые при аллергических заболеваниях и вызывающие опасные для жизни реакции организма. *Phoma betae* - фитопатогенный гриб, вызывающий распространенные заболевания свеклы и моркови. *Trichophyton rubrum* – патогенный гриб, являющийся одним из

основных возбудителей микозов стоп и ногтей. РНКазы - фермент класса гидролаз, главной функцией которого является расщепление фосфодиэфирных связей РНК. Гентамицин – аминогликозидный антибиотик широкого спектра действия, являющийся одним из эффективных средств лечения тяжелых гнойно-септических процессов.

Установлено, что ни один из вышеперечисленных Аг или Ат непосредственно не влияют на каталитическую активность ИХЭ. Введение же одного из компонентов иммунологической реакции в состав биочувствительной части совместно с ХЭ приводит лишь к незначительному изменению удельной каталитической активности фермента (табл. 1). Таким образом, для получения биочувствительной части ИФС оказалась возможной совместная иммобилизация ХЭ и Ат либо Аг.

Таблица 1.

Влияние совместной иммобилизации иммунореакта и холинэстеразы на удельную каталитическую активность фермента

Со-иммобилизованный реагент	Разведение Ат (Аг)	Удельная каталитическая активность ИХЭ, мкмоль/минхсм <sup>2</sup>	
		В отсутствие Ат (Аг)	В присутствии Ат (Аг)
Аг PhВ	1:20	29.6±0.5	30.9±0.8
IgE	1:50	25.4±0.4	25.7±0.6
Ат к TR	1:20	21.4±0.3	24.2±0.4
Ат к РНКазе	1:50	16.5±0.5	15.8±0.3
Ат к гентамицину	1:100	14.4±0.6	15.0±0.4

При разработке ИФС для определения специфического IgE человека для получения биочувствительной части проводили совместную иммобилизацию Аг PhВ в различных разведениях и ХЭ. Аналогично при разработке соответствующих ИФС для определения Аг PhВ, TR, РНКазы и гентамицина варьировали разведения поликлональных Ат.

Предлагаемый способ иммуноферментного определения изученных Аг и IgE основан на реакции образования иммунного комплекса Аг-Ат на поверхности биочувствительной части ИФС. Степень этого взаимодействия оценивается по величине аналитического сигнала при потенциале -0.55 В, который регистрировали, используя ИФС на основе совместно иммобилизованных ХЭ и Ат (Аг) в различных разведениях. Установлено, что образующийся иммунный комплекс может оказывать как активирующее, так и ингибирующее действие на каталитическую активность ИХЭ. Тип наблюдаемого эффекта зависит от условий проведения реакции, в частности, соотношения концентраций компонентов биоспецифических реакций.

В определенных интервалах концентраций определяемых биологически активных соединений наблюдалась линейная зависимость между величиной

соответствующего эффекта ингибирования или активации и концентрацией вводимого раствора Аг или IgE.

Аналитические возможности разработанных ИФС представлены в табл.2.

Таблица 2.

Аналитические характеристики иммуноферментных сенсоров для определения биологически активных соединений

Разведение At (*Ag)	Область рабочих концентраций, мг/мл	C <sub>min</sub> , мг/мл	Уравнение градуировочного графика, $\frac{Ip}{I_0} \times 100\% = a(-lg c) + b, r$		
			a	b	r
Иммуноглобулин E					
1:20*	5×10 <sup>-10</sup> -5×10 <sup>-4</sup>	2×10 <sup>-10</sup>	-(2.9±0.1)	129±1	0.9965
1:50*	5×10 <sup>-3</sup> -5×10 <sup>-3</sup>	8×10 <sup>-13</sup>	-(12.6±0.4)	151±1	0.9996
	1×10 <sup>-12</sup> -5×10 <sup>-7</sup>		-(4.7±0.2)	158±2	0.9933
1:100*	5×10 <sup>-8</sup> -5×10 <sup>-4</sup>	3×10 <sup>-8</sup>	-(2.6±0.1)	121.4±0.5	0.9981
Антиген Phoma betae					
1:10	1×10 <sup>-10</sup> -1×10 <sup>-6</sup>	5×10 <sup>-11</sup>	-(4.8±0.4)	150±2	0.9907
1:20	5×10 <sup>-12</sup> -8×10 <sup>-5</sup>	1×10 <sup>-12</sup>	-(2.8±0.2)	135±1	0.9944
1:50	1×10 <sup>-9</sup> -5×10 <sup>-6</sup>	8×10 <sup>-10</sup>	-(3.3±0.3)	133±2	0.9916
Антиген Trichophyton rubrum					
1:10	9×10 <sup>-11</sup> -9×10 <sup>-5</sup>	5×10 <sup>-11</sup>	-(5.9±0.2)	162±1	0.9973
1:20	8×10 <sup>-13</sup> -8×10 <sup>-6</sup>	1×10 <sup>-13</sup>	-(2.47±0.07)	138.4±0.7	0.9968
1:50	8×10 <sup>-11</sup> -8×10 <sup>-6</sup>	1×10 <sup>-11</sup>	-(7.0±0.1)	177.6±0.8	0.9995
Рибонуклеаза					
1:20	1×10 <sup>-4</sup> -1×10 <sup>-1</sup>	5×10 <sup>-5</sup>	6.80±0.02	69.42±0.06	0.9999
1:50	1×10 <sup>-9</sup> -2×10 <sup>-3</sup>	8×10 <sup>-10</sup>	-(8.2±0.5)	174±3	0.9946
1:100	1×10 <sup>-11</sup> -1×10 <sup>-7</sup>	5×10 <sup>-12</sup>	-(5.8±0.2)	167±2	0.9982
Гентамицин					
1:50	1×10 <sup>-4</sup> -1×10 <sup>-1</sup>	5×10 <sup>-5</sup>	2.2±0.4	82.7±0.2	0.9998
1:100	5×10 <sup>-9</sup> -1×10 <sup>-4</sup>	1×10 <sup>-9</sup>	-(3.3±0.2)	130±1	0.9958

Для многократного использования ИФС были подобраны условия регенерации его биочувствительной части путем разрушения образовавшегося иммунного комплекса. Установлено, что наиболее эффективным регенерирующим действием обладают концентрированные растворы мочевины. Обработка биочувствительной части ИФС 5 М раствором мочевины в течение не более 15 минут позволяет полностью разрушить иммунный комплекс и использовать ИФС для 3-5 последующих определений.

Скорость ферментативного процесса обусловлена большим числом факторов, среди которых pH, температура и характер инкубационной среды. В связи с этим проведено изучение влияния pH среды на удельную каталитическую активность ИХЭ и кинетические характеристики процесса. Установлено, что для ИХЭ, также как для нативного фермента, зависимость удельной активности от pH имеет колоколообразную форму, причем оптимум pH смещается в область щелочных pH и составляет для ИХЭ 9.05±0.05.



Величина аналитического сигнала, характеризующая глубину протекания ферментативной реакции, зависит от ряда факторов, в том числе от концентрации субстрата ( $C_S$ ) и активности ИХЭ, которая, в свою очередь, связана с наличием в растворе эффекторов фермента, в роли которых, в данном случае, выступают иммунные комплексы Аг-Ат. С этой точки зрения представляется достаточно важным определение кинетических характеристик процесса ферментативного гидролиза БТХИ под действием ИХЭ в различных условиях. В табл.3 приведены значения кинетических параметров (кажущейся константы Михаэлиса  $K_{m( каж )}$ , максимальной скорости  $V_m$ ) ферментативного гидролиза БТХИ в отсутствие и в присутствии эффекторов, полученные из анализа полных кинетических кривых.

Как показывает анализ данных табл. 3, вид эффекта, наблюдаемого в каждом конкретном случае, зависит от сочетания факторов. В большинстве случаев (для IgE, антигенов PhB, TR (разведение Ат 1:20), РНКазы (разведение Ат 1:50) и гентамицина (разведения Ат 1:50 и 1:100)) вид наблюдаемого эффекта сохраняется во всем изученном диапазоне концентраций. Наиболее часто проявляется эффект активации, что выражается в увеличении наблюдаемого аналитического сигнала. Так, для IgE, Аг TR и PhB ингибирующий эффект не наблюдался, а в случае РНКазы и гентамицина, ингибирование проявлялось только при достаточно больших концентрациях Ат, используемых для иммобилизации (табл.3, поз.6,7,11).

Увеличение каталитической активности фермента происходит вследствие того, что при определенном соотношении компонентов биоспецифического взаимодействия обеспечивается более удобный подход субстрата к активным центрам фермента, что приводит к увеличению количества электрохимически активного продукта ферментативной реакции. Можно предположить, что это связано с присутствием белковых макромолекул на поверхности биочувствительной части ИФС. Поскольку форма, в которой белки существуют в растворе, а также суммарный заряд молекул, зависят от pH, необходимо учитывать возможность их участия в электростатических взаимодействиях.

Учитывая, что изоэлектрические точки всех используемых в работе белков не превышают 8, а pH фонового электролита составляет  $9.05 \pm 0.05$ , следует предположить, что в условиях эксперимента макромолекулы будут иметь общий отрицательный заряд. Поэтому в качестве основной причины активирующего действия можно предположить возможность дополнительного электростатического взаимодействия между положительно заряженной катионной головкой БТХИ (используемого специфического субстрата ХЭ) и отрицательным суммарным зарядом Аг, который перекрывает общие заряды фермента и Ат при образовании соответствующего иммунного комплекса. Это приводит к накоплению молекул субстрата вблизи активных центров молекул фермента, увеличивая, таким образом, скорость ферментативного процесса.

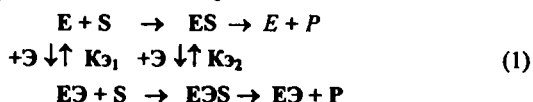
Таблица 3

Кинетические параметры ферментативной реакции гидролиза БТХИ в присутствии ИФС при различных разведениях антител (\*антигена)  
 $C_s = 2 \times 10^{-3} \text{ M}$ ,  $\text{pH } 9.05 \pm 0.05$  ( $n=5$ ,  $p=0.95$ )

Определяемый компонент	Разведение Ат (Ag)	$C_{Ag}$ , мг/мл	$V_m \times 10^7$ , мг/мл×с	$K_m(\text{ммг}) \times 10^4$ , мг/мл	№	Вид эффекта	
IgE	1:50*	0	3.9±0.2	23.8±0.9	1	Двухпараметрически согласованная активация	
		$5 \times 10^{-3}$	4.2±0.1	0.5±0.1			
		$5 \times 10^{-8}$	4.3±0.3	8.2±0.6			
		$5 \times 10^{-9}$	4.4±0.2	1.4±0.2			
		$5 \times 10^{-10}$	4.3±0.1	9.8±0.5			
		$5 \times 10^{-11}$	4.2±0.2	7.5±0.4			
		$5 \times 10^{-12}$	5.9±0.3	2.9±0.4			
Антиген PhB	1:20	0	3.8±0.2	21.7±1.2	2	Ассоциативная активация	
		$5 \times 10^{-6}$	3.8±0.3	9.6±0.8			
		$5 \times 10^{-8}$	3.8±0.2	16.3±0.5			
		$5 \times 10^{-10}$	3.8±0.4	6.1±0.4			
Антиген TR	1:20	0	4.0±0.1	28.8±0.6	3	Двухпараметрически согласованная активация	
		$5 \times 10^{-6}$	4.4±0.2	15.0±0.4			
		$5 \times 10^{-8}$	4.1±0.2	17.9±0.5			
		$5 \times 10^{-12}$	4.6±0.3	17.2±0.7			
	1:50	0	3.9±0.2	25.2±0.5	4	Двухпараметрически согласованная активация	
		$5 \times 10^{-6}$	4.3±0.1	4.8±0.4			
		$5 \times 10^{-8}$	5.8±0.2	4.2±0.5			
		$5 \times 10^{-10}$	3.8±0.2	3.8±0.3			
							5
	Рибонуклеаза	1:20	0	3.6±0.1	28.5±0.8	6	Двухпараметрически рассогласованное ингибирование
$1 \times 10^{-1}$			3.4±0.1	9.8±0.2			
$1 \times 10^{-2}$			0.46±0.06	1.55±0.05			
$1 \times 10^{-4}$			7.9±0.7	37.4±0.9			
1:50		0	3.8±0.2	25.8±0.7	8	Двухпараметрически согласованная активация	
		$1 \times 10^{-5}$	5.2±0.3	15.0±0.6			
		$1 \times 10^{-6}$	6.1±0.4	17.8±0.8			
1:100		0	3.7±0.3	23.7±0.8	9	Двухпараметрически согласованная активация	
		$1 \times 10^{-8}$	5.1±0.2	15.6±0.5			
							10
	$1 \times 10^{-9}$	4.9±0.3	40.9±1.3				
Гентамицин	1:50	0	2.4±0.2	28.8±0.9	11	Двухпараметрически рассогласованное ингибирование	
		$1 \times 10^{-2}$	1.9±0.3	16.5±0.1			
		$1 \times 10^{-3}$	1.9±0.5	15.7±0.6			
	1:100	0	2.7±0.3	29.7±1.5	12	Двухпараметрически согласованная активация	
		$1 \times 10^{-5}$	3.6±0.4	18.9±0.7			
		$1 \times 10^{-6}$	2.9±0.1	27.5±0.3			
		$1 \times 10^{-7}$	3.2±0.2	24.4±0.5			
		$1 \times 10^{-8}$	3.1±0.3	25.6±0.9			

Ингибирующее действие иммунного комплекса, наблюдаемое для РНКазы при использовании разведения Ат 1:20 и гентамицина при использовании разведения Ат 1:50, может быть связано с тем, что образуясь в больших количествах, вследствие высокой концентрации Ат, он создает стерические препятствия для быстрого подхода субстрата к ферменту, на что указывает уменьшение максимальной скорости реакции.

В то же время, для наблюдаемого в этих условиях двухпараметрически рассогласованного ингибирования характерно усиление связывания фермента с субстратом в присутствии эффектора. Поскольку  $C_S$  в этом случае достаточно велика, то увеличивается возможность взаимодействия фермента с субстратом. Предполагаемая схема реакции:



Здесь и далее жирным шрифтом выделены наиболее вероятные стадии ферментативной реакции.

При низких концентрациях РНКазы ( $1 \times 10^{-4}$  мг/мл) наблюдаемый эффект приобретает вид псевдоингибирования, характеризующийся уменьшением сродства фермента к субстрату и увеличением максимальной скорости реакции, что более типично для процессов активации (см. табл. 3, поз.7).

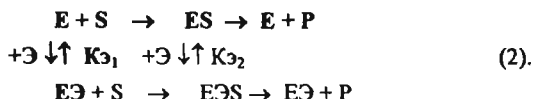
Поскольку в этих условиях иммунный комплекс образуется в сравнительно небольшом количестве, и стерические факторы становятся менее значимыми, возможно, определенный вклад в конечный процесс вносит эффект ингибирования фермента субстратом с образованием, вследствие высокой концентрации субстрата, неактивного тройного комплекса  $[ES_2]$ .

Среди эффектов активации наиболее часто встречается вид двухпараметрически согласованной активации (табл.3, поз.1,3,4,8,9,12), наблюдаемый в случае IgE, Ag TR, РНКазы (разведения Ат 1:50 и 1:100), а также гентамицина (разведение Ат 1:100). Увеличение максимальной скорости реакции и усиление связывания фермента с субстратом в присутствии эффектора позволяют предположить, что появление продукта обусловлено как распадом комплекса  $[E\bar{S}]$ , так и  $[ES]$ .

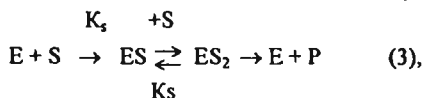
Присутствие иммунного комплекса способствует усилению связи фермента с субстратом, что отражается в изменении значений  $K_{m(наб)}$ , по сравнению с исходной (неактивируемой) реакцией. Можно предположить, что это происходит за счет дополнительной ориентации молекул субстрата около активных центров фермента, вследствие действия дополнительного электростатического притяжения, обеспечивающегося суммарным электростатическим зарядом иммунного комплекса. Концентрирование же субстрата в матрице при небольших концентрациях субстрата

( $C_s \leq K_{m(\text{каж})}$ ) приводит к уменьшению кажущейся константы Михаэлиса, а следовательно, к увеличению скорости процесса.

Проявление эффекта псевдоактивации, наблюдаемого для низкой концентрации Аг TR при использовании разведения Ат 1:50 (табл.3, поз.5), может быть обусловлено образованием в этих условиях меньшего количества иммунного комплекса, в результате чего наблюдается и меньшее активирующее действие на ИХЭ. Предполагаемая схема ферментативной реакции:



В случае РНказы при использовании разведения Ат 1:100 уменьшение концентрации Аг приводит к изменению вида эффекта с двухпараметрически согласованной на двухпараметрически рассогласованную активацию. Одной из причин этого может быть очень низкая концентрация иммунного комплекса на поверхности биочувствительной части ИФС, и вследствие этого, его незначительное влияние на ферментативный процесс. Определенный вклад в наблюдаемый эффект может вносить активация субстратом, присутствующим в растворе в больших концентрациях. В этих условиях возможно образование активного комплекса  $[ES_2]$ , вызывающего участие дополнительных молекул субстрата в ферментативном процессе, что приводит к увеличению  $V_m$  и  $K_{m(\text{каж})}$ . Возможная схема реакции:



Эффект ассоциативной активации, характеризующийся усилением связи фермента с субстратом и неизменностью максимальной скорости реакции, наблюдается для Аг PhB во всем изученном диапазоне концентраций (табл.3, поз.2). В данном случае, возможно, реакция протекает по схеме 2.

По-видимому, присутствие субстрата в высоких концентрациях не требует увеличения скорости ферментативного гидролиза субстрата с помощью эффектора, а усиление связывания фермента с субстратом в присутствии эффектора обусловлено концентрированием субстрата на поверхности биочувствительной части ИФС за счет электростатических сил.

В то же время значительное снижение (в 2-4 раза) концентрации субстрата приводит к уменьшению величины наблюдаемого аналитического сигнала, что отрицательно сказывается на чувствительности определения. Изучено влияние концентрации субстрата на кинетические характеристики ферментативного процесса. Установлено, что для большинства изученных соединений, за исключением Аг PhB, наилучшие результаты определения достигаются при использовании  $2 \times 10^{-3}$  М

раствора БТХИ. В случае Ag PhB предпочтительнее использовать более низкую ( $1 \times 10^{-3}$  М) концентрацию субстрата.

Использование кинетических подходов к изучению ферментативных реакций позволяет не только охарактеризовать возможные пути протекания этого процесса, но и высказать конкретные рекомендации для проведения иммуноопределений. По-видимому, при подборе условий протекания ферментативной реакции и выборе условий функционирования ИФС, следует отдавать предпочтение таким соотношениям компонентов биоспецифического взаимодействия (субстрата, Ag и Ат), при которых наблюдается эффект активации. В этом случае можно исследовать более широкий диапазон концентраций определяемых соединений с большей чувствительностью и лучшей воспроизводимостью результатов.

Таким образом, проведенные исследования позволили выбрать условия проведения иммуноопределения, обеспечивающие получение максимального по величине аналитического сигнала:

- pH боратного буферного раствора  $9.05 \pm 0.05$ ,
- $C_s = 2 \times 10^{-3}$  М (IgE, Ag TR, РНКазы, гентамицин) или  $1 \times 10^{-3}$  М (Ag PhB)
- Разведения Ат 1:20 для определения Ag TR и PhB, 1:50 - для определения РНКазы, 1:100 - для иммуноанализа гентамицина, и разведение Ag 1:50 для определения специфического IgE.

## **ОЦЕНКА ПРОЧНОСТИ СВЯЗЫВАНИЯ И СПЕЦИФИЧНОСТИ ИММУНОХИМИЧЕСКИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ ПО ДАННЫМ ВОЛЬТАМПЕРОМЕТРИИ**

Оценку величин констант связывания иммунных комплексов Ag-Ат проводили для Ag TR, PhB, рибонуклеазы и гентамицина и соответствующих антител, входящих в биочувствительную часть разработанных ИФС, а также для IgE, используя иммобилизованный Ag PhB.

Определяли равновесную концентрацию Ag или IgE в растворе после образования иммунного комплекса. Равновесную концентрацию иммунного комплекса Ag-Ат при постоянной концентрации Ат, используемых для иммобилизации, находили по разности между общей исходной концентрацией Ag или IgE и оставшейся в растворе после образования иммунного комплекса.

Для определения констант связывания были выбраны разведения Ат (Ag), позволяющие определять данные биологически активные вещества в наиболее широком диапазоне концентраций. Рабочие области концентраций Ag и IgE, а также концентрации иммобилизованных компонентов иммунологических реакций, используемых для определения констант связывания, представлены в табл. 4.

Таблица 4

Рабочие условия для определения констант связывания иммунных комплексов

Определяемое соединение	Разведение Ат (Аг)	Концентрация Ат (Аг), мг/мл	Рабочая область концентраций
IgE	1:50	0.022	$5 \times 10^{-8}$ - $2 \times 10^{-7}$
Аг PhB	1:20	0.05	$2 \times 10^{-7}$ - $5 \times 10^{-6}$
Аг TR	1:20	0.07	$5 \times 10^{-8}$ - $9 \times 10^{-7}$
РНКаза	1:50	0.02	$7 \times 10^{-6}$ - $1 \times 10^{-4}$
гентамицин	1:100	0.01	$5 \times 10^{-9}$ - $2 \times 10^{-8}$

Графическая обработка экспериментальных данных в координатах Скэтчарда позволила определить значения констант связывания иммунных комплексов. Результаты приведены в табл. 5.

Кроме того, исходя из графиков, рассчитаны концентрации активных центров Ат в системе, составившие  $2.4 \times 10^{-6}$  мг/мл для Ат к TR,  $7.3 \times 10^{-6}$  мг/мл для Ат к PhB,  $1.85 \times 10^{-4}$  мг/мл для Ат к РНКазе и  $1.5 \times 10^{-7}$  моль/л для Ат к гентамицину. Концентрация активных центров Аг PhB при определении специфического IgE составила  $1.6 \times 10^{-6}$  мг/мл.

Таблица 5

Эффективные значения констант связывания иммунных комплексов для совместно иммобилизованных иммунореагентов и холинэстеразы

Ка	Константа связывания, (мг/мл) <sup>-1</sup>
<b>Иммуноглобулин Е</b>	
Ка <sub>1</sub>	$(1.4 \pm 0.2) \times 10^{12}$
Ка <sub>2</sub>	$(2.1 \pm 0.2) \times 10^{11}$
Ка <sub>3</sub>	$(2.6 \pm 0.3) \times 10^{10}$
<b>Антиген Phoma betae</b>	
Ка <sub>1</sub>	$(4.9 \pm 0.4) \times 10^{10}$
Ка <sub>2</sub>	$(8.2 \pm 0.3) \times 10^8$
<b>Антиген Trichophyton rubrum</b>	
Ка <sub>1</sub>	$(3.7 \pm 0.2) \times 10^{11}$
Ка <sub>2</sub>	$(5.7 \pm 0.2) \times 10^9$
<b>Рибонуклеаза</b>	
Ка <sub>1</sub>	$(3.4 \pm 0.2) \times 10^9$
Ка <sub>2</sub>	$(1.9 \pm 0.3) \times 10^6$
<b>Гентамицин</b>	
Ка <sub>1</sub>	$(8.4 \pm 0.3) \times 10^8$
Ка <sub>2</sub>	$(4.0 \pm 0.3) \times 10^5$

Сопоставление эффективных значений констант связывания, полученных из соответствующих графиков, позволяет сделать вывод об относительной устойчивости образующихся иммунных комплексов. Наиболее прочное связывание достигается между высокомолекулярными Аг и Ат. В этих случаях эффективные значения

констант связывания превышают  $10^{10}$  (мг/мл)<sup>-1</sup>. Уменьшение молекулярной массы Аг приводит к снижению значений констант связывания. Так, для РНКазы значение  $K_{a1}$  составляет  $(3.4 \pm 0.2) \times 10^9$ , а для гентамицина -  $(8.4 \pm 0.3) \times 10^8$  (мг/мл)<sup>-1</sup>, что вполне удовлетворяет требованиям по константам связывания, предъявляемым к иммунологическим реакциям, используемым в аналитических целях, однако намного ниже соответствующих значений для IgE, Аг TR и PhB. Это может быть связано, с одной стороны, с тем, что с уменьшением молекулярной массы антигенные свойства несколько ухудшаются, вследствие чего соответствующие Ат имеют более низкое качество. С другой стороны, это может быть обусловлено более сильным влиянием условий эксперимента на молекулы РНКазы и гентамицина, поскольку изменение pH, по сравнению с его физиологическим значением, может вызвать существенные изменения структуры этих Аг, а следовательно, повлиять на способность их связывания с Ат. В случае гентамицина необходимо учитывать также и то, что Ат образуются к конъюгату антибиотика с белком, в результате чего их связывание с низкомолекулярным гаптеном является менее прочным.

Для количественной оценки специфичности действия иммунореагентов, используемых в данном варианте ИФА, проводили определение процентов перекрестных реакций.

Оценивали специфичность IgE человека и поликлональных Ат, специфичных к Аг PhB, по отношению к Аг *Phoma rostrupii* и *Phytophthora infestans*. Установлено, что IgE не взаимодействует с Аг *Phytophthora infestans*, а перекрестная реактивность к Аг *Phoma rostrupii* составляет 0.1%. Поликлональные Ат не взаимодействуют с Аг таких грибов как *Alternaria tenuis*, *Cladosporium herbarum*, *Aspergillus fumigatus* и *Phytophthora infestans*, но в то же время обладают групповой специфичностью и реагируют с Аг *Phoma rostrupii* (перекрестная реакция 85%), что позволяет использовать разработанный ИФС на основе данных Ат также и для выявления фомозной гнили моркови. Установлено, что Аг PhB способен взаимодействовать с Ат, относящимися к классам IgE и IgG, причем наиболее прочное связывание достигается при использовании IgE человека, специфичного по отношению к данному Аг. Проценты перекрестных реакций Аг PhB составляют  $4.3 \times 10^{-6}$ ,  $0.8 \times 10^{-5}$  и 2.5 % для IgE кролика, IgG человека и кролика соответственно. Таким образом, специфичность действия Ат обусловлена присутствием IgE человека или, в случае кроличьих поликлональных Ат, иммуноглобулина G.

Определение перекрестной реактивности поликлональных Ат против Аг TR по отношению к Аг патогенных грибов *Trichophyton mentographites* (TM) и *Microsporum canis* (MC), вызывающих сходные по клинической картине заболевания, показало, что проценты перекрестных реакций составляют  $1.3 \times 10^{-2}$  и  $6.3 \times 10^{-5}$  для Аг TM и MC соответственно, что подтверждает высокую специфичность используемых Ат.

## ПРИМЕНЕНИЕ ИММУНОФЕРМЕНТНЫХ СЕНСОРОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

Разработанные ИФС использовали для определения изученных биологически активных веществ в клинических образцах, пищевых продуктах и фармпрепаратах.

Определение IgE: Соответствующий ИФС применяли для выявления IgE в сыворотке крови и подтверждения диагноза аллергического заболевания в двух группах больных. Первую группу составили сыворотки от детей с выраженными симптомами сенсибилизации к грибу и положительными кожными пробами на аллерген из данного гриба. Вторую группу (контрольную) составили сыворотки от детей с аллергическими заболеваниями, но не имеющие в анамнезе указания на сенсибилизацию плесневым грибом *Phoma betae*. Некоторые из полученных результатов приведены в табл.6. Результаты определения IgE с помощью разработанного ИФС хорошо согласуются с данными анамнеза и результатами кожных проб, что свидетельствует о возможности использования разработанного ИФС для проведения ускоренной диагностики аллергических заболеваний, вызываемых плесневым грибом *Phoma betae*, и оценки степени тяжести поражения за счет количественного определения содержания специфического IgE в анализируемой пробе.

Таблица 6.

Сравнительная оценка медицинских исследований и аналитических определений IgE  
с помощью иммуноферментного сенсора (n=5, p=0.95)

№	Анамнез	Результаты кожных проб	Определение с помощью ИФС	
			Концентрация IgE, мг/мл	Sr
1	×	+++	$(2.7 \pm 0.1) \times 10^{-3}$	0.04
2	×	+++	$(4.2 \pm 0.2) \times 10^{-4}$	0.05
3	×	+++	$(1.6 \pm 0.1) \times 10^{-4}$	0.06
4	×	+++	$(1.1 \pm 0.1) \times 10^{-4}$	0.09
5	×	+++	$(1.4 \pm 0.1) \times 10^{-4}$	0.07
6	×	++	$(1.7 \pm 0.1) \times 10^{-5}$	0.06
7	×	++	$(4.3 \pm 0.2) \times 10^{-6}$	0.04
8	×	++	$(3.1 \pm 0.3) \times 10^{-6}$	0.09
9	×	++	$(3.2 \pm 0.2) \times 10^{-7}$	0.06
10	×	+	$(7.1 \pm 0.3) \times 10^{-9}$	0.04
Контрольная группа				
11	-	-	$(2.5 \pm 0.2) \times 10^{-10}$	0.08
12	-	-	$(2.8 \pm 0.1) \times 10^{-10}$	0.03
13	-	-	$(8.9 \pm 0.4) \times 10^{-10}$	0.04

- -отсутствие аллергии к *Phoma betae*, отрицательный результат кожной пробы на аллерген из данного гриба

×

+++ - Высокая интенсивность кожной пробы

++ - Средняя интенсивность кожной пробы

+



Определение Ag PhV: Для диагностики грибковых заболеваний растений, вызываемых фитопатогенными грибами рода *Phoma*, и с целью оценки качества сельскохозяйственной продукции проводили количественное определение Ag PhV в образцах корнеплодов и семян с помощью разработанного ИФС. Некоторые из полученных результатов приведены в табл.7. Предлагаемый ИФС делает возможным определение Ag PhV на ранних стадиях развития заболевания, т.е. тогда, когда еще не наблюдается видимых поражений (см. табл.7, позиции 3,7), а также оценить качество семян. Все это способствует своевременному выявлению заболевания и дает возможность принять меры для предотвращения его дальнейшего развития.

Таблица 7.

Использование амперометрического иммуноферментного сенсора для определения грибковых антигенов *Phoma betae* в растительных образцах (n=5; p=0.95)

№	Образец	Видимые признаки заболевания	Найдено, мг/мл	St
1	Корнеплоды моркови	+	$(8.8 \pm 0.2) \times 10^{-7}$	0.02
2		+	$(3.2 \pm 0.3) \times 10^{-8}$	0.09
3		-	$(4.5 \pm 0.6) \times 10^{-10}$	0.13
4	Семена моркови	-	$(6.7 \pm 0.5) \times 10^{-10}$	0.07
5	Корнеплоды свеклы	+	$(5.5 \pm 0.2) \times 10^{-7}$	0.03
6		+	$(7.1 \pm 0.6) \times 10^{-8}$	0.08
7		-	$(4.9 \pm 0.3) \times 10^{-10}$	0.06
8	Семена свеклы	-	$(4.5 \pm 0.5) \times 10^{-9}$	0.11
9		-	$(2.1 \pm 0.3) \times 10^{-10}$	0.14

+ наличие явных признаков грибкового заболевания

- отсутствие видимых признаков грибкового заболевания

Определение Ag TR: Разработанный ИФС использовали для определения Ag TR и уточнения диагнозов в трех группах сывороток крови от больных с различными формами кожных заболеваний. К первой группе были отнесены больные с выраженной клинической картиной микоза, у которых по данным микологических исследований были выделены патогенные грибы. Вторую группу составили сыворотки от больных, у которых заболевание ихтиозом могло скрывать признаки микоза. В этом случае постановка диагноза была сильно затруднена. В третью группу вошли сыворотки от больных с кожными заболеваниями в отсутствие грибковой инфекции. Сопоставление результатов медицинских, микологических и аналитических исследований представлено в табл. 8.

Полученные данные свидетельствуют о хорошем согласовании результатов аналитических (с помощью ИФС) и микологических определений, что позволяет проводить ускоренную диагностику заболеваний, вызываемых патогенным грибом TR, даже на ранних стадиях развития, когда выявление возбудителя несколько затруднено (табл.8, поз. 8, 16, 17, 18). Анализ с помощью ИФС позволяет также проводить дифференцированную диагностику различных форм кожных заболеваний, делая возможным своевременное применение правильного лечения.

Таблица 8

Сравнительная оценка микологических исследований и аналитических определений антигена TR с помощью ИФС. (n=5; p=0.95)

№	Медицинский диагноз	Микологические исследования		Определение с помощью ИФС	
		Выявление возбудителя	Интенсивность грибкового заболевания	Концентрация Аг, мг/мл	Sr $\times 10^2$
1	МИКОЗ	+	xxx	$(1.2 \pm 0.1) \times 10^{-6}$	0.08
2		±	xxx	$(1.2 \pm 0.1) \times 10^{-12}$	0.06
3		±	xx	$(1.5 \pm 0.1) \times 10^{-12}$	0.05
4		+	xx	$(5.0 \pm 0.2) \times 10^{-13}$	0.04
5		±	xx	$(1.4 \pm 0.1) \times 10^{-13}$	0.06
6		+	xx	$(4.5 \pm 0.2) \times 10^{-13}$	0.03
7		±	xx	$(9.5 \pm 0.3) \times 10^{-14}$	0.02
8		-	x	$(4.7 \pm 0.3) \times 10^{-13}$	0.05
9	ИХТИОЗ+МИКОЗ	+	xxx	$(8.1 \pm 0.3) \times 10^{-6}$	0.03
10		+	xxx	$(4.9 \pm 0.1) \times 10^{-9}$	0.02
11		±	xxx	$(1.6 \pm 0.1) \times 10^{-12}$	0.05
12		+	xx	$(1.3 \pm 0.1) \times 10^{-10}$	0.06
13		±	xx	$(2.0 \pm 0.1) \times 10^{-11}$	0.05
14		+	xx	$(5.9 \pm 0.2) \times 10^{-12}$	0.03
15		±	x	$(2.2 \pm 0.1) \times 10^{-13}$	0.04
16	ИХТИОЗ+МИКОЗ	-	x	$(5.0 \pm 0.3) \times 10^{-13}$	0.05
17		-	x	$(2.6 \pm 0.2) \times 10^{-14}$	0.06
18		-	x	$(1.9 \pm 0.2) \times 10^{-14}$	0.08
19		±	x	$(7.2 \pm 0.4) \times 10^{-15}$	0.05
20	ИХТИОЗ	-	-	-	-
21		-	-	-	-
22		-	-	-	-

- + Обнаружен патогенный гриб *Trichophyton rubrum*  
 ± Обнаружены близкородственные виды патогенных грибов  
 - Патогенные грибы не обнаружены  
 xxx Среднетяжелое течение грибкового заболевания  
 xx Среднелегкое течение грибкового заболевания  
 x Легкое течение грибкового заболевания  
 - Отсутствие грибкового заболевания

Определение рибонуклеазы: Проведено определение РНКазы в образцах мяса и мясopодуlктов с помощью ИФС, результаты представлены в табл. 9. Полученные результаты показывают, что используемые Ат обладают перекрестной реактивностью по отношению к РНКазе, содержащейся в свинине и мясе кур. Однако рассчитанное содержание РНКазы в этих случаях в 10-100 раз ниже, чем для говядины. В то же время для образцов рыбы (минтай, лещ) и растительного белка перекрестная реактивность Ат отсутствует. Это позволяет использовать разработанный ИФС для оценки содержания говядины в мясopодуlктах и выявления фальсифицированной продукции.

Таблица 9

Определение РНКазы в образцах мяса и мясopодуктов (n=5, p=0.95)

№	Образец	Концентрация РНКазы, мг/мл	Sr
1	Мясо свежее (говядина)	$(3.3 \pm 0.2) \times 10^{-3}$	0.06
2	Мясо (говядина) после замораживания		
	а) Сок	$(5.0 \pm 0.3) \times 10^{-6}$	0.06
	б) Экстракт	$(2.4 \pm 0.2) \times 10^{-6}$	0.08
3	Фарш говяжий	$(4.1 \pm 0.3) \times 10^{-8}$	0.07
4	Фарш "Домашний" (говядина и свинина, 1:1)	$(8.5 \pm 0.4) \times 10^{-9}$	0.05
5	Мясо (свинина) после замораживания	$(3.8 \pm 0.4) \times 10^{-9}$	0.10
6	Мясо (курица) после замораживания	$(1.7 \pm 0.2) \times 10^{-9}$	0.12
7	Рыба свежая (лещ)	менее $10^{-9}$	-
8	Колбаса говяжья "Московская" (Казанский	$(2.2 \pm 0.3) \times 10^{-8}$	0.13
9	мясокомбинат)		
10	Колбаса ливерная (Казанский мясокомбинат)	$(1.5 \pm 0.2) \times 10^{-7}$	0.13
11	Колбаса куриная (Агрофирма "Ак барс-Пестрецы)	$(7.6 \pm 0.5) \times 10^{-8}$	0.07
12	Растительный белок (соя)	менее $10^{-9}$	-

Определение гентамицина: Гентамицин разрешен к применению в качестве антимикробного агента в медицине и ветеринарии для лечения ряда инфекций человека, а также крупного рогатого скота в США и большинстве стран Европы. Вследствие этого возможно присутствие остаточных количеств гентамицина в пищевых продуктах животного происхождения, в частности, в молоке. В табл. 10 приведены некоторые результаты определения гентамицина в молоке, выпускаемом различными производителями, с помощью ИФС. Максимально допустимый остаточный уровень гентамицина в продуктах питания, установленный Европейским Союзом, составляет 100 мкг/л.

Таблица 10.

Определение гентамицина с помощью ИФС в молоке (n=5, p=0.95)

№	Название, жирность (предприятие-производитель)	Найдено, мкг/л	Sr
1	"Домик в деревне", 3,5% (Лиаозовский молочный комбинат, г. Москва)	$7.5 \pm 0.5$	0.06
2	"Милая Мила", 2,5% (ОАО "Царицынский молочный комбинат", г. Москва)	$(5.8 \pm 0.3) \times 10^{-2}$	0.05
3	3,2% (Казанский молочный комбинат)	$(1.4 \pm 0.2) \times 10^{-3}$	0.14
4	3,2% (ОАО "Эдельвейс", г. Казань)	$(1.7 \pm 0.1) \times 10^{-5}$	0.05

Эффективность действия гентамицина в отношении широкого круга микроорганизмов обуславливает его выпуск в виде различных лекарственных форм, контроль содержания гентамицина в которых имеет большое значение при производстве антибиотиков. Разработанный ИФС был использован для определения гентамицина в образцах фармпрепаратов, результаты представлены в табл. 11. Содержание гентамицина в лекарственных формах указано по данным анализа по Фармакопее РФ.

Таблица 11.

Определение гентамицина с помощью ИФС в лекарственных формах (n=5, p=0.95)

№	Образец	Введено, мг/мл (по прописи)	Найдено, мг/мл	Sr
1	Порошок гентамицина	$2.5 \times 10^{-5}$	$(2.5 \pm 0.3) \times 10^{-5}$	0.12
2	Раствор для инъекций, 4%	$5.0 \times 10^{-5}$	$(4.3 \pm 0.6) \times 10^{-5}$	0.13
3	Глазные капли, 0,3%	$5.0 \times 10^{-6}$	$(4.8 \pm 0.4) \times 10^{-6}$	0.08

Использование разработанных ИФС на основе совместно иммобилизованных фермента и иммунореагента является весьма перспективным для нужд биомедицинского анализа. Проведенное исследование доказывает возможность использования единого типа ИФС для определения биологически активных соединений, значительно отличающихся по своим свойствам, структуре, происхождению и физиологическому действию.

Использование способности иммунных комплексов влиять на каталитическую активность иммобилизованной холинэстеразы позволило существенно расширить возможности вольтамперометрии, как метода анализа, сделав возможным разработку амперометрических ИФС для определения как высокомолекулярных Аг и Ат, а также ферментов, так и низкомолекулярных соединений, например, лекарственных препаратов.

Разработанные методики определения биологически активных веществ с помощью ИФС, не требующие использования меченых компонентов иммунологической реакции, позволили существенно снизить стоимость анализа, а также сократить время его выполнения за счет отсутствия стадий разделения иммунного комплекса и несвязавшихся компонентов биоспецифического взаимодействия. Селективность определения, обусловленная использованием высокоспецифичных Ат, позволила значительно упростить пробоподготовку анализируемых образцов, а в ряде случаев – полностью ее устранить.

Результаты определения биологически активных соединений с помощью ИФС и их корреляция с данными медицинских и микологических исследований позволяют представить практические рекомендации по использованию разработанных ИФС для экспресс - диагностики аллергических и грибковых заболеваний.

## ВЫВОДЫ

1. Предложена модель амперометрических иммуноферментных сенсоров для определения отличающихся по природе и физиологическому действию биологически активных соединений, в том числе, специфического IgE человека, антигенов фитопатогенного гриба *Phoma betae* и патогенного гриба *Trichophyton rubrum*, рибонуклеазы и гентамицина.
2. Разработан способ получения биочувствительной части ИФС, основанный на совместной иммобилизации холинэстеразы и антител (антигена), обеспечивающий сохранение каталитической активности фермента и способности иммунореагента вступать в иммунохимическое взаимодействие.
3. На основании кинетических параметров ферментативной реакции гидролиза БТХИ выбраны рабочие условия проведения иммуноопределений с помощью ИФС, обеспечивающие получение максимального аналитического сигнала:
  - pH боратного буферного раствора  $9.05 \pm 0.05$ ;
  - $C_s = 2 \times 10^{-3}$  M (IgE, Ag TR, РНКазы, гентамицин) и  $1 \times 10^{-3}$  M (Ag PhB);
  - разведение Ат 1:20 для определения Ag TR и PhB, 1:50 - для определения РНКазы, 1:100 - для иммуноанализа гентамицина, и разведение Ag 1:50 для определения IgE.
  - интервалы рабочих концентраций составили:  $1 \times 10^{-12}$ – $5 \times 10^{-7}$  мг/мл для IgE,  $5 \times 10^{-12}$ – $8 \times 10^{-5}$  мг/мл для Ag PhB,  $8 \times 10^{-15}$ – $8 \times 10^{-6}$  мг/мл для Ag TR,  $1 \times 10^{-9}$ – $2 \times 10^{-5}$  мг/мл для РНКазы;  $5 \times 10^{-9}$ – $1 \times 10^{-4}$  мг/мл для гентамицина.Нижние границы определяемых содержаний при этих условиях составляют:  $8 \times 10^{-13}$  мг/мл для IgE,  $1 \times 10^{-12}$  мг/мл для Ag PhB,  $1 \times 10^{-15}$  мг/мл для Ag TR,  $8 \times 10^{-10}$  мг/мл для РНКазы и  $1 \times 10^{-9}$  мг/мл для гентамицина.
4. Значения констант связывания иммунных комплексов составляют:  $K_{a1} = (1.4 \pm 0.2) \times 10^{12}$ ,  $K_{a2} = (2.1 \pm 0.2) \times 10^{11}$  и  $K_{a3} = (2.6 \pm 0.3) \times 10^{10}$  (мг/мл) $^{-1}$  для иммунного комплекса Ag PhB - IgE при использовании иммобилизованного Ag PhB;  $K_{a1} = (4.9 \pm 0.4) \times 10^{10}$  и  $K_{a2} = (8.2 \pm 0.3) \times 10^8$  (мг/мл) $^{-1}$  при использовании иммобилизованного IgE;  $K_{a1} = (3.7 \pm 0.2) \times 10^{11}$ ,  $K_{a2} = (5.7 \pm 0.2) \times 10^9$  (мг/мл) $^{-1}$  для иммунного комплекса Ag TR-Ат;  $K_{a1} = (3.4 \pm 0.2) \times 10^9$  и  $K_{a2} = (1.9 \pm 0.3) \times 10^6$  (мг/мл) $^{-1}$  для иммунного комплекса РНКазы-Ат и  $K_{a1} = (8.4 \pm 0.3) \times 10^8$  и  $K_{a2} = (4.0 \pm 0.3) \times 10^5$  (мг/мл) $^{-1}$  для иммунного комплекса гентамицин-Ат.
5. Перекрестная реактивность используемых иммунореагентов не превышает 0.1%, что свидетельствует о возможности высокоселективного определения изученных биологически активных соединений.
6. Разработаны методики определения специфического IgE и антигена *Trichophyton rubrum* в сыворотке крови человека, антигена *Phoma betae* – в экстрактах растений, рибонуклеазы и гентамицина в пищевых продуктах, а также гентамицина – в лекарственных формах.

7. Представлены практические рекомендации для использования иммуноферментных сенсоров в экспресс - диагностике аллергических и грибковых заболеваний.

**Основное содержание диссертационной работы изложено  
в следующих публикациях:**

1. Медянцева Э.П., Халдеева Е.В., Глушко Н.И., Будников Г.К. Использование амперометрического иммуноферментного сенсора для определения *Trichophyton rubrum* // Тез. докл. XVI Менделеевского съезда по общей и прикладной химии. Санкт-Петербург. 1998. Т. 4 (Химия живого). С. 98.
2. Medyantseva E.P., Khaldeeva E.V., Glushko N.I., Budnikov H.C.. Enzyme immunosensor for determination of *Trichophyton rubrum* // Abstr. EUROSENSORS XII Conf. Southampton, UK. 1998.-4.3.10.
3. Халдеева Е.В., Глушко Н.И., Медянцева Э.П., Будников Г.К. Новый вариант иммуноферментного анализа для определения патогенных грибов // Тез. докл. Международной конференции по аналитической химии. Алматы, Казахстан. 1998. С.70-71.
4. Medyantseva E.P., Khaldeeva E.V., Bormotova Y.I., Shusharina A.E., Budnikov H.C., Glushko N.I.. Optimization of voltammetric control of immunological reactions // Abstr. of International Conf. on Modern Electroanalytical Methods. Sec. Czech Republic. 1999. PO/21.
5. Халдеева Е.В., Шушарина А.Е.. Аналитические возможности иммуноферментного сенсора для определения *Trichophyton rubrum*// Тез. докл. II Всеросс. конф. молодых ученых "Современные проблемы теоретической и экспериментальной химии". Саратов. 1999. С.147.
6. Халдеева Е.В., Медянцева Э.П., Шушарина А.Е., Будников Г.К.. Использование вольтамперометрических данных для определения физико-химических параметров биоспецифических взаимодействий// Тез. докл. V Всеросс. конф. "Электрохимические методы анализа" (ЭМА-99). Москва. 1999. С.222-223.
7. Халдеева Е.В., Медянцева Э.П., Глушко Н.И., Будников Г.К.. Использование иммуноферментных сенсоров для диагностики заболеваний, вызываемых патогенными грибами // Тез. докл. Всеросс. конф. "Химический анализ веществ и материалов". Москва. 2000. В-4. С.99.
8. Халдеева Е.В., Медянцева Э.П., Глушко Н.И., Будников Г.К.. Использование амперометрического иммуноферментного сенсора для диагностики грибковых заболеваний// Тез. докл. Всеросс. конф. с международным участием "Сенсор 2000. Сенсоры и микросистемы." С.-Петербург. 1-С-25. С. 97.
9. Khaldeeva E.V., Medyantseva E.P., Shusharina A.E., Glushko N.I., Budnikov H.C.. Application of kinetic data for optimization of electrochemical immunoassay.// Abstr. of 8<sup>th</sup> International Conf. on ElectroAnalysis (ESEAC 2000). Bonn, Germany. 2000. C34.

10. Халдеева Е.В., Медянцева Э.П., Глушко Н.И., Иманаева Н.А., Будников Г.К.. Иммунохимическое определение антигена патогенного гриба *Phoma betae* в овощных культурах. // Тез. докл. IV Всеросс. конф. по анализу объектов окружающей среды "Экоаналитика-2000". Краснодар. 2000. С.235.
11. Халдеева Е.В., Медянцева Э.П., Будников Г.К. Аналитические возможности иммуносенсоров для определения иммуноглобулинов / Сб. научных трудов "Электрохимические, оптические и кинетические методы в химии" - Казань. КГУ. 2000. С. 297-305.
12. Medyantseva E.P., Khaldeeva E.V., Glushko N.I., Budnikov H.C. Amperometric enzyme immunosensor for the determination of the antigen of the pathogenic fungi *Trichophyton rubrum* // *Analytica Chimica Acta*. 2000. V.411. n. 1-3. P.13-18.
13. Халдеева Е.В., Медянцева Э.П., Глушко Н.И., Будников Г.К. Определение антигена *Phoma betae* с помощью амперометрического иммуноферментного сенсора // *Аналитика и контроль*. 2001. Т. 5, №1. С.47-53.
14. Кутырева М.П., Медянцева Э.П., Халдеева Е.В., Дыхал Ю.И., Глушко Н.И., Будников Г.К. Кинетические параметры реакции холинэстеразного гидролиза в присутствии иммунного комплекса антитело-антиген // *Журн. общ. химии*. 2001. Т. 71, вып.2. С. 329-338.
15. Халдеева Е.В., Медянцева Э.П., Глушко Н.И., Будников Г.К. Амперометрический иммуноферментный сенсор для оценки степени поражения овощных культур фитопатогенными грибами // *Агрохимия*. 2001. №5. С.81-86.
16. Халдеева Е.В., Иманаева Н.А., Медянцева Э.П. Определение гентамицина с помощью амперометрического иммуноферментного сенсора // Тез. докл. III Всеросс. конф. молодых ученых "Современные проблемы теоретической и экспериментальной химии" Саратов. 2001. С.181.
17. Medyantseva E.P., Khaldeeva E.V., Kutyreva M.P., Glushko N.I., Budnikov H.C. Analytical abilities of immunoextraction for pharmaceutical and biomedical analysis // *Abstr. Balaton Symposium on high-performance separation methods*. Siófok, Hungary. 2001. B.42.
18. Khaldeeva E.V., Medyantseva E.P., Safina G.R., Budnikov H.C. Optimization of enzyme immunoassay using kinetic data // *Abstr. 7<sup>th</sup> International Symposium on kinetics in analytical chemistry*. Bucharest, Romania. 2001. P24.
19. Медянцева Э.П., Халдеева Е.В., Будников Г.К. Иммуносенсоры в биологии и медицине: аналитические возможности, проблемы и перспективы // *Журн. аналит. химии*. 2001. Т.56. № 10. (в печати).

Соискатель



Е.В. Халдеева

2 -

Издательство "Отечество"

420107, Казань, ул.Свердлова, 12.

Лицензия на издательскую деятельность №0217 от 17.11.97 г.  
выдана Министерством информации и печати Республики Татарстан

Лицензия на полиграфическую деятельность №0128 от 08.06.98г.  
выдана Министерством информации и печати Республики Татарстан

Подписано в печать 11.10.2001 г.

Форм. бум. 60х84 1/16. Печ. л. 1,5. Тираж 100. Заказ 141.

Миниитография института проблем информатики АН РТ  
420012, Казань, ул. Чехова, 36.